

甄张赫, 朱锐丹, 秦松, 等. 重组别藻蓝蛋白的超快能量传递过程[J]. 海洋学报, 2021, 43(9): 115–125, doi:10.12284/hyxb2021120  
Zhen Zhanghe, Zhu Ruidan, Qin Song, et al. Ultra-fast energy transfer process of recombinant allophycocyanin[J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(9): 115–125, doi:10.12284/hyxb2021120

## 重组别藻蓝蛋白的超快能量传递过程

甄张赫<sup>1†</sup>, 朱锐丹<sup>2,3†</sup>, 秦松<sup>1,4</sup>, 陈海龙<sup>3</sup>, 蒲洋<sup>5</sup>, 翁羽翔<sup>2,3\*</sup>, 李文军<sup>1,4\*</sup>

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院物理研究所 北京凝聚态物理国家研究中心/软物质物理重点实验室, 北京 100190; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 5. 鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264025)

**摘要:** 藻胆体是红、蓝藻特有的光合作用捕光天线复合物。别藻蓝蛋白 (APC) 是组成藻胆体高效能量传递的核心结构的主要成分。本文以基因重组的别藻蓝蛋白 (rAPC) 的单体和三聚体为材料, 通过稳态光谱、圆二色光谱以及超快时间分辨光谱研究了 rAPC 的结构构象和能量传递过程。结果表明, rAPC 在测试条件下能保持和天然 APC 一致的光谱特性和活性构象; rAPC 单体组装成三聚体后, 其  $\alpha^{84}$ PCB 和  $\beta^{84}$ PCB 可以组成激子色素对, 通过激子分裂提高三聚体的能量传递效率; 超快时间分辨光谱结果显示, 在 rAPC 三聚体中, 能量从 620 nm 传至 650 nm 的时间为 300~600 fs, 同时存在着 19 fs 的激子态的电子退相干过程。这些结果为揭示藻胆体的高效能量传递机制提供了数据基础。

**关键词:** 别藻蓝蛋白; 重组异源表达; 能量传递; 稳态光谱; 瞬态光谱

中图分类号: Q949.2; Q946.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2021)09-0115-11

### 1 引言

藻类进行光合作用的第 1 步是捕捉光能并将光能传递至光合反应中心, 该过程是由藻类捕光蛋白完成的<sup>[1]</sup>。藻胆体是蓝藻和红藻中非常重要的捕光复合物, 主要由杆结构和核结构两部分组成<sup>[2-3]</sup>。藻胆体的杆结构可以帮助藻类在水下的弱光环境高效地捕捉光能, 而藻胆体的核结构可以将杆结构捕捉的光能以 95% 以上的效率传递至光合反应中心<sup>[4-5]</sup>。

别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 三聚体是红、蓝藻藻胆体核结构的主要组成成分之一<sup>[6]</sup>。晶体结构揭示 (图 1), APC 三聚体是由 3 个单体组成的厚约为 3 nm, 直径约为 13 nm 的圆盘状结构, 中央存在 1 个直径约为 3.5 nm 的可插入连接蛋白的空腔<sup>[7-8]</sup>。APC

三聚体每个单体包含 1 个  $\alpha$  亚基和 1 个  $\beta$  亚基, 每个  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的 Cys<sup>84</sup> 位点都结合有 1 个藻蓝胆素 (phycocyanobilin, PCB), 这些 PCB 可以与氨基酸共同构成发色团, 发色团参与了 APC 的捕光和能量传递<sup>[9]</sup>。

虽然 APC 三聚体只结合有 6 个 PCB, 但 APC 三聚体内部的能量传递却非常快速<sup>[10]</sup>。APC 三聚体 Cys<sup>84</sup> 位点上的两个发色团结构与蓝藻的藻蓝蛋白 (Cyanobacteria-phycocyanin, C-PC) 三聚体 Cys<sup>84</sup> 位点上的两个发色团的结构相似, 但是 APC 三聚体电子弛豫的速度是 C-PC 的 10 倍<sup>[7, 11]</sup>。APC 三聚体的能量吸收光谱从 620 nm 传递到 650 nm 的时间约为 200~600 fs<sup>[12-13]</sup>。这种快速的能量传递方式被认为与 APC 相邻单体之间的两个发色团 ( $\beta^{84}$ PCB,  $\alpha^{84}$ PCB) 的强耦合相关。由于强耦合作用产生了电子态的能级分裂,

收稿日期: 2021-02-19; 修订日期: 2021-04-13。

基金项目: 国家自然科学基金 (41906109); 中国科学院前沿科学重点研究项目 (QYZDJ-SSW-SYS017)。

†作者简介: 甄张赫 (1992—), 女, 辽宁省盖平县人, 博士研究生, 研究藻类捕光蛋白结构及其功能机制。E-mail: zhzhen@yic.ac.cn; 朱锐丹 (1992—), 男, 广东省揭阳市人, 博士研究生, 研究光合捕光蛋白的超快传能机制。E-mail: zhuruidan@iphy.ac.cn

\*通信作者: 翁羽翔, 研究员, 主要从事光合捕光天线蛋白的超快传能和动态调控机制的研究。E-mail: yxweng@aphy.iphy.ac.cn; 李文军, 副研究员, 主要从事藻类功能蛋白的结构功能和应用研究相关工作。E-mail: wjli@yic.ac.cn

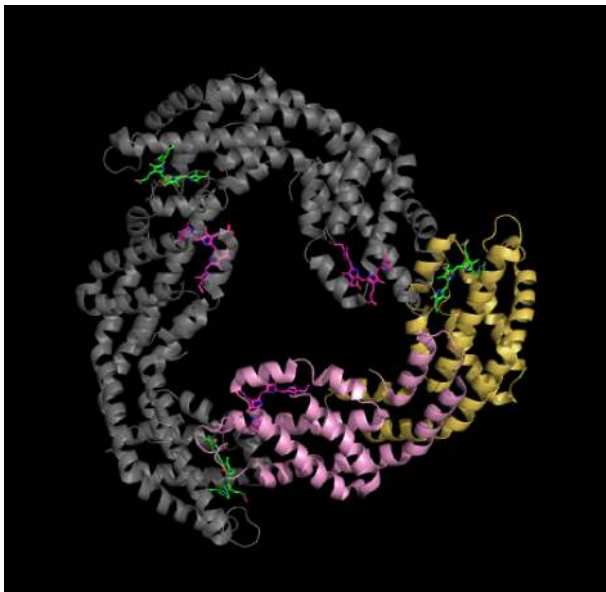


图1 别藻蓝蛋白三聚体晶体结构图

Fig. 1 Allophycocyanin trimer crystal structure

结构信息下载于PDB数据库 (<http://www1.rcsb.org/>), PDB 码为 4F0U; 灰色螺旋为别藻蓝蛋白的螺旋结构, 灰色杆代表色素分子; 粉色螺旋和黄色螺旋组成了别藻蓝蛋白的单体, 其中黄色螺旋为别藻蓝蛋白  $\alpha$  亚基, 粉色螺旋为别藻蓝蛋白  $\beta$  亚基; 绿色杆代表  $\alpha^{84}$ PCB; 粉色杆代表  $\beta^{84}$ PCB

The structure data is downloaded from the PDB database (<http://www1.rcsb.org/>), PDB code is 4F0U; the gray spiral represents spiral structure of allophycocyanin; the gray sticks represent pigment molecules; the pink spiral ( $\beta$  subunit) and the yellow spiral ( $\alpha$  subunit) constitute the allophycocyanin monomer; green sticks represent  $\alpha^{84}$ PCB; pink sticks represent  $\beta^{84}$ PCB

导致激发态波函数在两个色素分子间离域, 并加速了能量传递进程<sup>[9]</sup>。在其他文献报道的超快时间分辨光谱的动力学分析中, 均拟合有 10~30 fs 的超短时间常数。通常认为, 这可能反映了激子态上的弛豫时间<sup>[9]</sup>。并且, 有研究发现<sup>[14]</sup>, APC 的初始各向异性明显大于 0.4, 这证明 APC 三聚体中存在着相干激发态的色素分子对。目前, 有观点认为, 在隐藻藻胆蛋白 PE545 以及 PC645 中存在的强耦合色素分子对导致了量子相干节拍的产生, 且部分离域振动可使能量传递速率增强<sup>[15-16]</sup>。因此, 别藻蓝蛋白中存在的强激子耦合可能也会引发相干能量转移, 以加速并辅助 APC 的定向能量转移, 这可能是藻胆体核心结构高效并快速转移能量的主要原因<sup>[14]</sup>。但是 3 种机制是如何相互配合的, 一直以来是 APC 高效传能的研究热点和难点。

研究 APC 的高效光能传递规律, 需要具备高纯度的 APC 亚基、单体和三聚体等, 如果从蓝藻中制备, 需要引入 SDS、尿素或者极端 pH 作为蛋白质变

性条件, 这个过程虽然能获得部分单体或者亚基, 但是获得的亚基、单体和三聚体等往往出现降解, 产生混合物, 如果加大变性条件, 又会损伤 APC 的发色团空间结构, 造成测试结果的不准确甚至错误。此外, 目前一些报道所用的 APC 样品为商品化的冻干蛋白粉末, 冻干、复溶等步骤都有可能对蛋白构象造成不易觉察的伤害, 从而导致色基微环境发生变化。所以, APC 自组装过程中, 藻胆素分子的构象变化是否影响色素耦合状态, 进一步改变藻胆素分子的能量状态一直是研究 APC 高效传能的瓶颈。

针对 APC 高效传能机制以及对 APC 自组装过程中藻胆素及传能关系的研究, 本文以重组异源表达<sup>[17-18]</sup>的具有和天然 APC 一样结构特性和稳态光谱特性的重组别藻蓝蛋白 (recombinant allophycocyanin, rAPC) 单体和三聚体为实验材料<sup>[17, 19-20]</sup>, 通过各种稳态和瞬态光谱技术对 rAPC 三聚体不同时间尺度的能量传递过程进行了检测, 探究 rAPC 自组装过程中, 藻胆素分子的构象变化, 其产生的色素耦合状态是否会改变藻胆素分子的能量状态; 探究重组 rAPC 自组装过程中, 伴随结构和构象的变化, 长距离的福斯特共振能量转移机制 (föster resonance energy transfer, FRET)、短距离的激子耦合理论 (dexter mechanism) 以及空间离域的“相干态传能”3 种机制是如何相互配合以实现 APC 的高效能量传递。这将为继续深入研究 rAPC 激发态的能量传递过程, 揭示藻胆体核心高效快速的能量转移机制提供了数据基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品准备及鉴定

将本实验室自构建的含有 rAPC 质粒的生物工程大肠杆菌接种于含卡那霉素 (索莱宝, 北京) (浓度: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及壮观霉素 (麦克林, 上海) (浓度: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB (Luria-Bertani) 培养基 (索莱宝, 北京) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜, 次日以 1% 接种量重新接种至 LB 培养基中 (含抗性), 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至对数中期 ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  约为 0.7) ( $\text{OD}$  为光吸收密度), 然后加入 IPTG (索莱宝, 北京) (浓度: 0.5  $\text{mmol}/\text{L}$ ), 28 $^{\circ}\text{C}$  过夜诱导表达。18 h 后离心 (12 000 $\times g$ , 2 min) 收集菌体。此时, 对诱导前后的菌体以荧光显微镜 (Olympus BX51, 日本) 进行蓝光和绿光激发, 并采集荧光发射图。其中质粒构建、蛋白表达及诱导的方法参考 Liu 等<sup>[17]</sup>的方法。

将菌体用 20  $\text{mmol}/\text{L}$  的缓冲盐缓冲液 (pH: 6.0) 重悬 (浓度: 0.1  $\text{g}/\text{mL}$ ), 以细胞超声破碎仪 (功率: 300 W) (新芝, 宁波) 破碎 (破碎 3 s, 停止 5 s) 至重悬液均一。破碎后离心 (10 000 $\times g$ , 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ) 并收集上清

液。上清液用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 通过重力法过 Ni-IDA 琼脂糖凝胶柱 (康为世纪, 中国北京) 进行纯化。对纯化收集得到的 rAPC 通过 30 kD 超滤管 (Millipore, 美国) 浓缩去咪唑, 然后通过不连续蔗糖梯度密度 (蔗糖密度依次为: 0.3 mol/L、0.6 mol/L、0.8 mol/L、1.0 mol/L、1.5 mol/L) 继续进行纯化, 离心力为 200 000 $\times g$ , 温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ , 时间为 21 h。rAPC 纯化方法参考 Liu 等<sup>[17]</sup>、李文军等<sup>[20]</sup>的方法。对收集的蓝色 rAPC 三聚体蛋白进行各种光谱检测, 同时对蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白胶鉴定。部分 rAPC 三聚体用于制备 rAPC 单体, 参考 Liu 等<sup>[17]</sup>的方法, 设置 rAPC 单体为宽带泵浦探测的对照组。

## 2.2 光谱特性测定

用 Agilent Cary 60 紫外吸收光谱仪对 rAPC 进行 250~800 nm 的全波长扫描, 用 Agilent Cary Eclipse 荧光光谱仪测定 rAPC 的荧光发射光谱, 激发波长为 620 nm。用 Chirascan plus 的圆二色光谱仪对 rAPC 三

聚体进行 180~260 nm 的紫外区扫描以及 250~750 nm 的可见光区扫描, 光径均为 1 mm。

## 2.3 时间分辨光谱探测

为了探测 rAPC 的超快时间分辨传能过程, 自行研制的非共线光参量放大器 (NOPA) 被用于进行宽带泵浦探测, NOPA 装置具体参数参考 Zhu 等<sup>[21]</sup>、王云鹏等<sup>[22]</sup>的方法。NOPA 宽带脉冲覆盖范围为 550~760 nm, 该范围覆盖了 rAPC 的吸收范围。NOPA 的脉冲宽度为 11 fs, 可用于检测大于 11 fs 的传能过程。其泵浦源是光谱中心为 800 nm 的 35 fs 掺钛蓝宝石脉冲激光放大器 (Spitfire Ace; Spectra-Physics), 重复频率为 1 kHz。rAPC 样品的最大吸光度 OD 值控制在 0.3~0.4 之间, 样品厚度为 1 mm。

## 3 结果和讨论

### 3.1 rAPC 三聚体蛋白表达、纯化及成分鉴定

当 rAPC 在大肠杆菌中被诱导表达后, 如图 2a 和

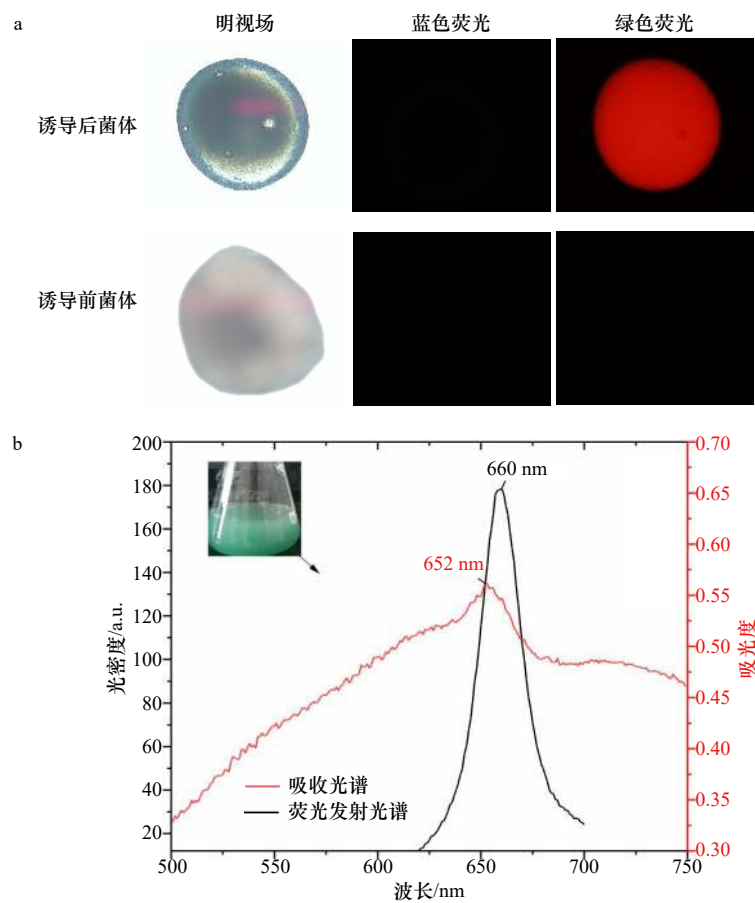


图 2 诱导后菌体的稳态光谱及荧光性质变化

Fig. 2 Steady-state spectra and fluorescence properties of induced bacteria

- a. 诱导前和诱导后的菌体在蓝光和绿光激发下的荧光发射图片; b. 诱导后绿色菌体的稳态吸收光谱和荧光发射光谱 ( $\text{Ex}_{615\text{ nm}}$ )  
a. Fluorescence emission pictures of the bacteria before and after induction (green light excitation); b. steady-state absorption and fluorescence emission spectra ( $\text{Ex}_{615\text{ nm}}$ ) of the blue-green bacteria after induction

图 2b 所示, 菌体呈现绿色, 这是 rAPC 的蓝色和大肠杆菌的黄色叠加色。收集诱导前和诱导后的菌体, 发现诱导后的菌体受表达的 rAPC 的颜色影响呈天蓝色, 诱导前的菌体依然是大肠杆菌原本的淡黄色。通过蓝光和绿光对菌体进行激发, 结果如图 2a 所示, 诱导前的菌体对蓝光和绿光均无反应。而诱导后的菌体在蓝光下无反应, 但是在绿光下被激发出红色的荧光, 红光的光谱区间位于 625~740 nm<sup>[23]</sup>, 这符合 APC 三聚体可于 660 nm 处产生荧光发射的光谱特性<sup>[24]</sup>, 说明 rAPC 诱导表达成功。

以诱导前的菌体为基线, 对诱导后的大肠杆菌进行全波段稳态吸收光谱扫描, 如图 2b 所示, 在 652 nm 处有明显的吸收峰, 以 600 nm 为激发波长测量菌体的荧光发射光谱, 最大荧光发射峰位于 660 nm 处。该结果符合 rAPC 三聚体的光谱特征<sup>[25]</sup>, 证明了 rAPC 在大肠杆菌中被成功的诱导表达且其表达的  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基已经成功组装成为三聚体。

通过不连续蔗糖密度梯度离心对 rAPC 进行纯化的结果如图 3a 所示。少量 rAPC 单体位于 0.6 mol/L 蔗糖分层处, 多数的 rAPC 三聚体位于 0.8 mol/L 蔗糖分层处。rAPC 三聚体呈天蓝色(图 3b)。蔗糖密度分离结果说明, 异源表达的 rAPC 多数可组装成为三聚体, 但是可能由于其两个亚基的表达比例不平衡, 或部分亚基组装有误导致部分单体不能成功组装成三聚体。吸取 rAPC 三聚体进行 SDS-PAGE 蛋白胶鉴定, 结果证实 rAPC 三聚体  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的分子量分别约为 21 kD 和 19 kD(图 3c)<sup>[7, 26]</sup>。

### 3.2 rAPC 三聚体稳态光谱特性

rAPC 三聚体的稳态吸收光谱(图 4a)显示, 在可见光区 650 nm 处存在 1 个特征吸收峰, 620 nm 及 590 nm 处存在吸收肩峰, 这与二阶导数显示的吸收峰趋势一致。而 rAPC 单体仅在 620 nm 处存在一个吸收峰。二阶导数吸收光谱确认吸收峰趋势与稳态吸收光谱一致(图 4a)。其中, rAPC 三聚体 650 nm 处的特征吸收峰与天然 APC 三聚体的吸收光谱一致<sup>[14, 24, 27]</sup>。有研究人员认为, APC 三聚体中的  $\beta^{84}$ PCB 通过与周围氨基酸的相互作用而导致的吸收光谱红移至 650 nm, 而  $\alpha^{84}$ PCB 则保留原有构象, 吸收峰依旧为 620 nm<sup>[28-31]</sup>。但也有少数观点认为, 光谱红移是由于  $\alpha^{84}$ PCB 的构象发生了变化<sup>[25]</sup>。但是考虑到  $\beta$  亚基进化上更为保守, 关于  $\beta$  亚基构象变化的晶体学数据也更加充分, 目前多数观点支持前者的结论, 且认为在 rAPC 三聚体中能量遵循 FRET, 可以从  $\alpha^{84}$ PCB 传递至  $\beta^{84}$ PCB。除了 FRET 能量转移机制, 也有观点认为, 吸收峰红移至 650 nm 是由于激子耦合理论导致, 也就是说是由于相邻单体之间的两个发色团之间的距离小于 20 Å 而发生的强耦合导致<sup>[32-33]</sup>。目前公认的观点是, 在 APC 三聚体的能量传递过程中, FRET 和激子耦合能量转移共同存在。值得注意的是, rAPC 三聚体 620 nm 处的吸收肩峰, 对比天然 APC 三聚体, 该峰更明显一些。我们认为, 这是由于在蛋白溶液中存在少量未组装成三聚体的单体或由三聚体解聚的游离单体导致。rAPC 三聚体在 590 nm 处的吸收肩峰, 虽在其他的数据中均也有被观测到, 但对于它的解释较少。结

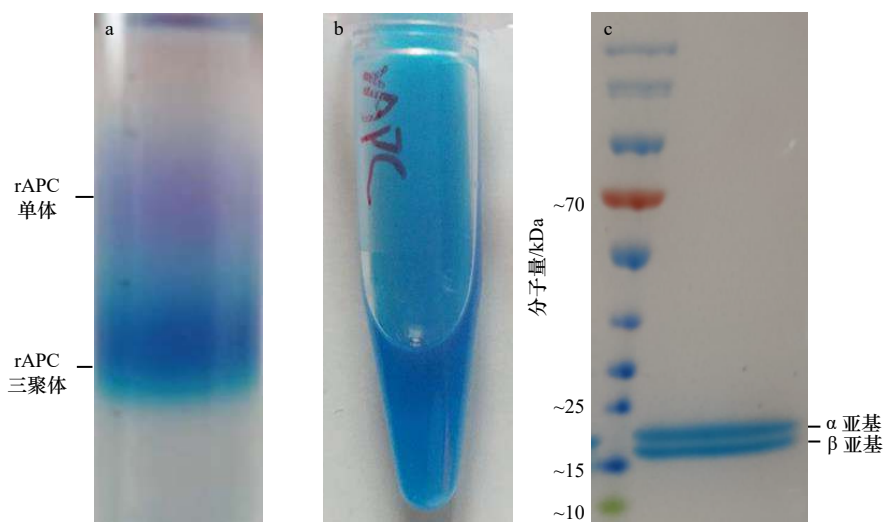


图 3 rAPC 三聚体纯化及亚基鉴定

Fig. 3 Purification and composition identification of rAPC trimer

a. rAPC 蔗糖密度分离结果, 上层 rAPC 单体, 下层 rAPC 三聚体; b. rAPC 三聚体; c. rAPC 三聚体 SDS-PAGE 蛋白电泳图  
a. rAPC sucrose density separation result, upper rAPC monomer, lower rAPC trimer; b. rAPC trimer; c. SDS-PAGE protein electrophoresis of rAPC trimer

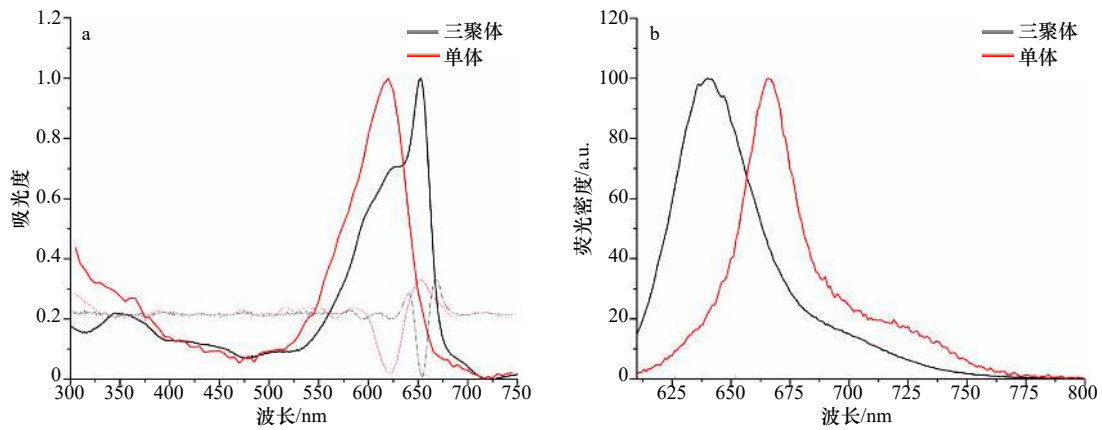


图4 rAPC单体和三聚体的稳态吸收光谱及荧光发射光谱

Fig. 4 Steady-state absorption spectra and fluorescence spectra of rAPC trimer

a. rAPC单体和三聚体的稳态吸收光谱,为了方便对比,进行了0~1区间的归一化处理,粉色虚线为单体吸收光谱的二阶导数图,灰色虚线为三聚体吸收光谱的二阶导数图;b. rAPC单体和三聚体的稳态荧光发射光谱,为了方便对比进行了0~100区间的归一化处理

a. The steady-state absorption spectra of rAPC monomer and trimer are normalized in the range of 0–1 for the convenience of comparison, the pink dotted line is the second derivative diagram of the monomer absorption spectrum, and the gray dotted line is the second derivative diagram of the trimer absorption spectrum; b. the steady-state fluorescence emission spectra of rAPC monomer and trimer are normalized in the interval of 0–100 for the convenience of comparison

合本实验及其他文章报道的圆二色(Circular Dichroism, CD)光谱数据(详见3.3节),我们认为,该处可能存在弱耦合的能量传递过程<sup>[12–13, 20, 34]</sup>。此外,在近紫外区340~370 nm附近还存在藻胆素的特征吸收峰<sup>[35–36]</sup>。

rAPC单体和三聚体的稳态荧光发射光谱显示(图4b),以600 nm激发rAPC单体,rAPC单体的最大荧光发射峰位于640 nm处,而rAPC三聚体的最大荧光发射峰位于663 nm(图4),这是APC三聚体的特征荧光发射峰,证明了rAPC三聚体组装成功,该结果与其他报道一致。在720 nm左右存在一个荧光发射肩峰,这被认为可能对应 $1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 附近的电子振动

耦合跃迁<sup>[13–14, 16]</sup>。

### 3.3 rAPC三聚体圆二色光谱特性

对rAPC三聚体进行CD紫外区和可见光区的光谱探测,设定rAPC单体为对照组。紫外区可反映rAPC的二级结构的组装情况,可见光区则可反映rAPC色基微环境的变化<sup>[37]</sup>。

分析rAPC单体及三聚体CD的紫外区光谱(图5a),发现两者具有一样的光谱特性,均在209 nm和222 nm处表现出吸收特征,这说明rAPC单体组装成三聚体的过程不影响蛋白质的二级结构。在CD光谱中,209 nm和222 nm反映的是 $\alpha$ 螺旋结构, $\beta$ 折叠则反映在216 nm

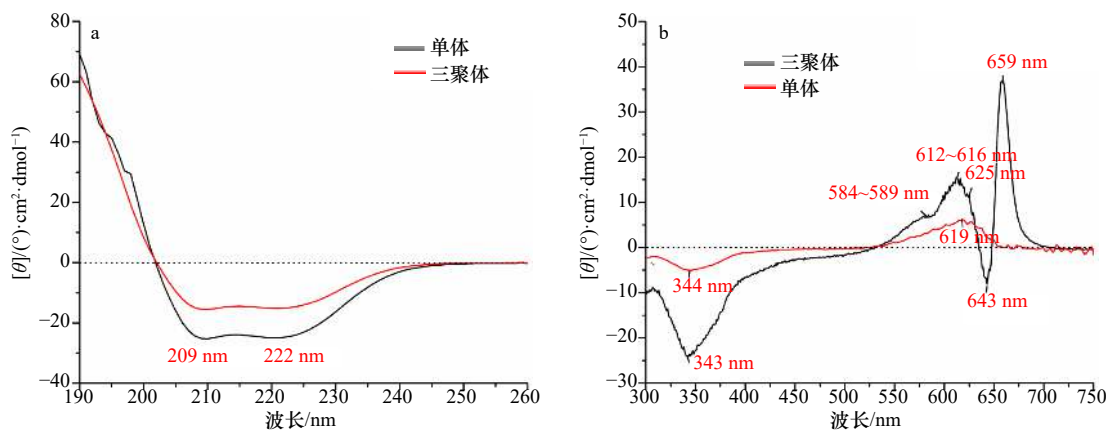


图5 rAPC单体和三聚体的CD光谱

Fig. 5 CD spectra of rAPC monomer and trimer

a. rAPC单体和三聚体CD的紫外区光谱;b. rAPC单体和三聚体CD的可见光区光谱

a. Circular dichroism spectra of rAPC monomer and trimer in the ultraviolet region; b. circular dichroism spectra of rAPC monomer and trimer in the visible region

处<sup>[38-39]</sup>。因此,本实验结果揭示了 rAPC 主要以  $\alpha$  螺旋结构为主,不存在  $\beta$  折叠结构。

对 rAPC 单体和三聚体 CD 的可见光区光谱进行探测发现(图 5b),rAPC 单体 CD 可见光区的光谱仅显示了 619 nm 处的正峰以及 344 nm 处的负峰。相比而言,rAPC 三聚体的 CD 可见光区光谱则显示出了更多的峰:659 nm 和 612~616 nm 处存在两个正峰,643 nm 和 343 nm 处存在两个负峰,正负峰交汇,出现了 3 个零点:648 nm、635 nm 以及 530 nm。此外,特别发现在 584~589 nm 和 625 nm 处存在波动的小肩峰。这证实了 rAPC 从单体组装成三聚体后色基微环境变得复杂。

在天然 APC 三聚体的 CD 光谱中,也存在 659 nm 处的正峰以及 643 nm 处的负峰,本实验结果与之相符,且其他报道已通过解叠法证明它们组成了一对正负峰<sup>[34,40-41]</sup>。多数观点认为,这两个峰的存在支持了 650 nm 处的生色团对由于偶极-偶极相互作用而导致激子分裂的观点,能量因此跃迁至 659 nm 以及 643 nm 波长处<sup>[41]</sup>。此外,343 nm 处出现的负峰也较为明显,该峰对应于稳态吸收光谱 340 nm 范围内 PCB 的吸收峰。

需要特别分析的是,本实验中 584~589 nm 处和 625 nm 处为波动的小肩峰。而在其他 APC 三聚体 CD 光谱的报道中,589 nm 处为负峰,625 nm 处为正峰,且将 CD 光谱解叠后,这两个峰组成了正负峰对,有部分观点认为,这个正负峰对是 APC 三聚体中存在弱耦合色素对的证据<sup>[34,41]</sup>。然而,在本实验的结果中,625 nm 处的正峰似乎蓝移至 612~616 nm 处,而 589 nm 处的负峰仅表现为一个小肩峰(图 5b)。考虑到其他多种研究证明的 APC 三聚体 CD 光谱的复杂性<sup>[42-43]</sup>,我们推测,这可能是由于不同实验中生色团所处的微环境的异质性导致的 CD 光谱存在差异,例如本实验溶液中存在的部分的游离单体(导致 620 nm 处的吸收肩峰更明显),可能导致弱耦合信号更加减弱。此外,结合吸收光谱,我们认为,589 nm 处的 CD 光谱负峰可能与吸收光谱中 590 nm 处的吸收峰相对应,因此,590 nm 处很可能有弱耦合发色团对相关的能量传递过程。综上,rAPC 三聚体的 CD 光谱基本与天然 APC 三聚体的 CD 光谱结果一致。证明了 rAPC 三聚体中存在着强耦合的发色团对,且强耦合导致了激子分裂,该结果同时也是 rAPC 三聚体结构完整性及能量传递高效性的一个辅助证据。

### 3.4 rAPC 三聚体能量传递的宽带泵浦探测分析

为了能够测量 rAPC 三聚体在百飞秒内的能量传

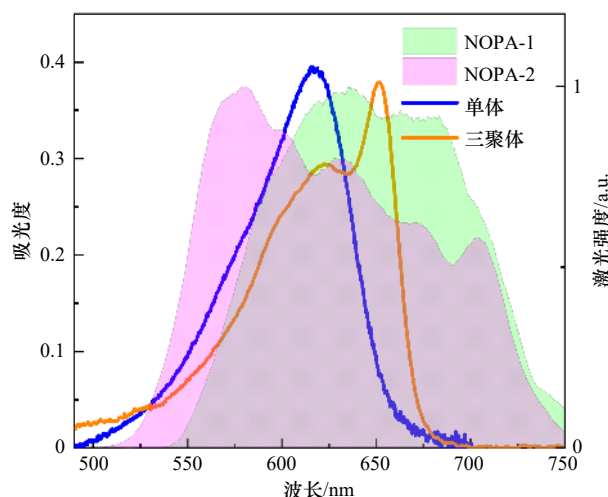


图 6 NOPA 脉冲覆盖范围及 rAPC 单体和三聚体稳态吸收光谱

Fig. 6 Coverage of NOPA pulse and steady-state absorption spectra of rAPC trimer

NOPA-1. rAPC 三聚体探测脉冲覆盖范围; NOPA-2. rAPC 单体探测脉冲覆盖范围

NOPA-1. rAPC trimer detection pulse coverage; NOPA-2. rAPC monomer detection pulse coverage

递过程,本实验对 rAPC 三聚体进行了宽带泵浦探测实验,同时设定 rAPC 单体为对照组,脉冲覆盖范围及样品吸收光谱如图 6 所示。为了避免由于多光子吸收所引起的额外的超快非线性过程<sup>[44]</sup>,在进行宽带泵浦探测之前,先对 rAPC 单体和三聚体分别进行激发能量依赖的宽带泵浦探测实验(图 7)。分析动力学早期  $T$  等于 100 fs 时  $\Delta OD$  值的变化,可以看到,无论是 rAPC 单体或三聚体,在激发能量密度小于  $40 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  的激发条件下都随着激发能量密度呈线性变化。但特别的,当三聚体的能量密度超过  $70 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  时, $\Delta OD$  不再是线性变化,有可能是出现了多光子吸收的过程<sup>[44]</sup>,这将影响后续的光谱分析,因此实验所采用的激发能量密度均小于  $40 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 。

对宽带泵浦探测结果进行动力学拟合。在 rAPC 单体在 620 nm 处拟合出 3 个时间寿命常数,分别为  $(57 \pm 10)$  fs、 $(7.4 \pm 4.8)$  ps 以及 400 ps; rAPC 三聚体在 620 nm 处拟合出 3 个时间寿命常数,分别为  $(19 \pm 7)$  fs、 $(630 \pm 100)$  fs 以及 400 ps; 在 656 nm 处拟合出两个时间寿命常数,分别为  $(470 \pm 100)$  fs 以及 400 ps(表 1)。rAPC 单体  $(57 \pm 10)$  fs 和  $(7.4 \pm 4.8)$  ps 两个寿命常数被认为对应于单体的快速溶剂化过程,这与 8a 图中单体由于溶剂化而光谱红移并伴随动力学衰减的结果相一致<sup>[45-46]</sup>。而 rAPC 三聚体  $(19 \pm 7)$  fs 以及  $(630 \pm 100)$  fs 两个时间常数被认为对应于三聚体的能量传递过程,将

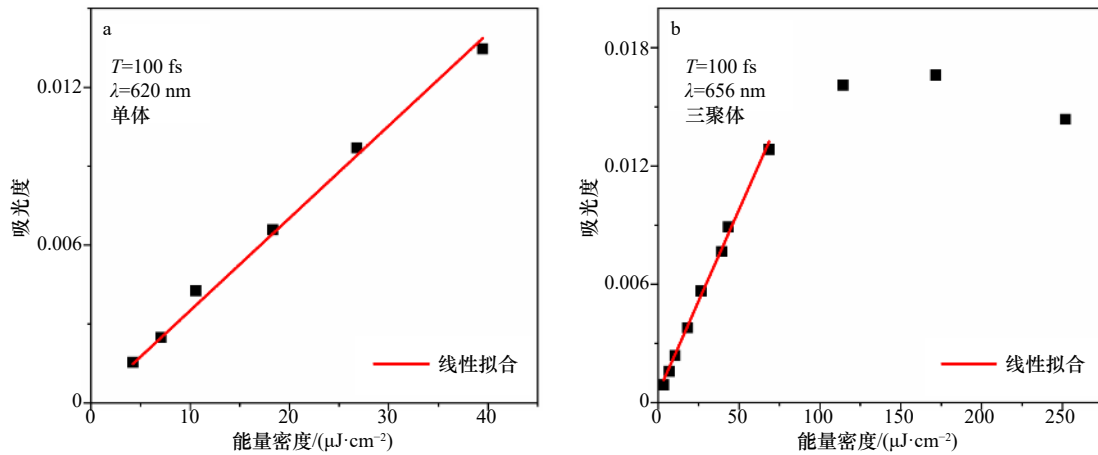


图7 rAPC 单体及三聚体的激发能量依赖

Fig. 7 Excitation energy dependence of rAPC monomer and trimer

a. rAPC 单体激发能量依赖线性拟合; b. rAPC 三聚体激发能量依赖线性拟合

a. The linear fitting of excitation energy in rAPC monomer; b. the linear fitting of excitation energy in rAPC trimer

表1 rAPC 单体和三聚体瞬态吸收动力学拟合常数

Table 1 The fitting constants of rAPC trimer transient absorption dynamics

样品	波长	时间寿命常数1	时间寿命常数2	时间寿命常数3
rAPC单体	620 nm	(57±10)fs	(7.4±4.8)ps	400 ps
rAPC三聚体	620 nm	(19±7)fs	(630±100)fs	400 ps
rAPC三聚体	656 nm	-	(470±100)fs	400 ps

注: -代表未拟合到时间寿命常数。

在后面做细致的讨论。其中最后一个寿命(400 ps)为固定的寿命参数,因为超出了实验所采集的时间范围(100 ps)。

19 fs的超短时间常数与其他文献中报道的10~60 fs的时间常数相一致,这样短的传能时间通常被认为与相干过程有关,该时间常数在其他报道中被指认为是两个PCB分子组成的激子对的电子退相干时间<sup>[12-14,27]</sup>。考虑到本次实验的脉冲宽度为11 fs,检测到19 fs的电子退相干时间是有可能的<sup>[47]</sup>。但是该时间常数所代表的具体相干过程目前还没有研究进行细致的报道,关于相干传能过程的具体研究还需要后续借助于高分辨率的二维时间分辨光谱技术来完成<sup>[48]</sup>。470~630 fs的时间常数我们认为是能量在620 nm和656 nm这两个吸收峰代表的色素之间无辐射衰减的过程。这与宽带泵浦探测的其他动力学分析结果相一致。如图8b所示,对比rAPC单体(图8a),600 fs内rAPC三聚体在656 nm处表现了显著的能量增长,而在620 nm处表现出能量弛豫(图8b),这证实了三聚体中能量从620 nm向656 nm传递的过程。

截取不同时间分辨率下的宽带泵浦探测光谱进

行动力学分析(图9b),其中光谱中的负峰表示基态漂白和受激发射的信号贡献,而正峰表示激发态吸收过程。在 $T$ 等于104 fs时的光谱中明显的干涉信号是由于样品对激发光的散射造成的。结果显示,rAPC三聚体在0~600 fs的过程中,618~625 nm范围内的负峰逐渐减弱,这反映了能量从620 nm传递至656 nm的过程几乎在600 fs以内完成。但与其他报道不同的是,在本实验中655~658 nm处的信号基本保持不变,而不是信号显著增长。这是因为在其他报道中泵浦探测用的是窄带激发脉冲,因此650 nm处的信号仅反映了由620 nm传递过去的能量<sup>[27]</sup>。而本实验采用的宽带脉冲可以直接激发656 nm。对比rAPC单体的瞬态光谱变化(图9a),发现rAPC单体625.5 nm处的负峰红移至633 nm,该红移过程被认为是由于溶剂化过程导致<sup>[49]</sup>。但红移现象在三聚体中并不明显(仅红移3 nm),这可能是由于三聚体中色素之间存在强耦合使溶剂化过程减弱。

rAPC三聚体不同时间下瞬态光谱结果显示了三聚体的整体传能过程(图9b),激发0 fs后的瞬态光谱形状对比稳态光谱基本没有改变:在650 nm左右处

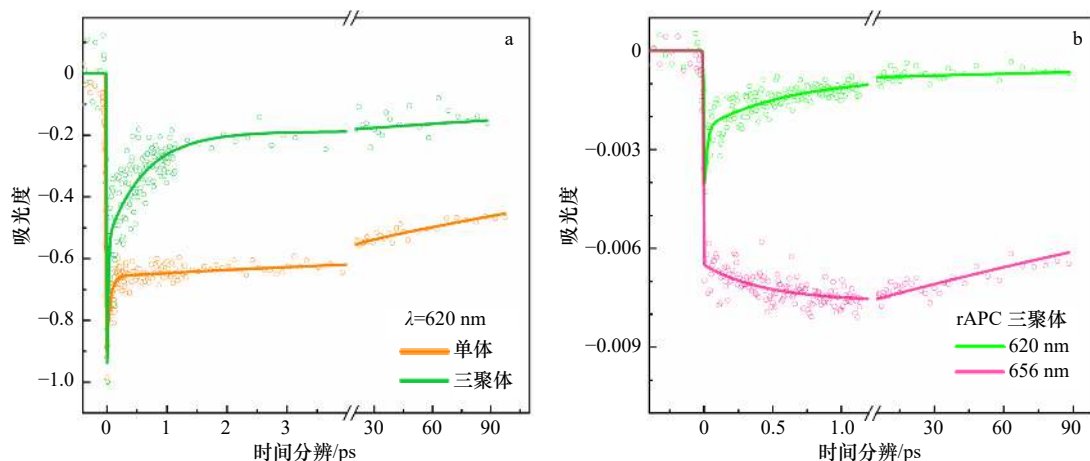


图 8 rAPC 三聚体及单体的瞬态探测

Fig. 8 Transients detected of rAPC trimer and monomer

a. rAPC 单体和三聚体在 620 nm 处的能量传递动力学拟合曲线; b. rAPC 三聚体在 620 nm 及 656 nm 处的能量传递动力学拟合曲线

a. Fitting curve of energy transfer kinetics of rAPC monomer and trimer at 620 nm; b. fitting curve of energy transfer kinetics of rAPC trimer at 620 nm and 656 nm

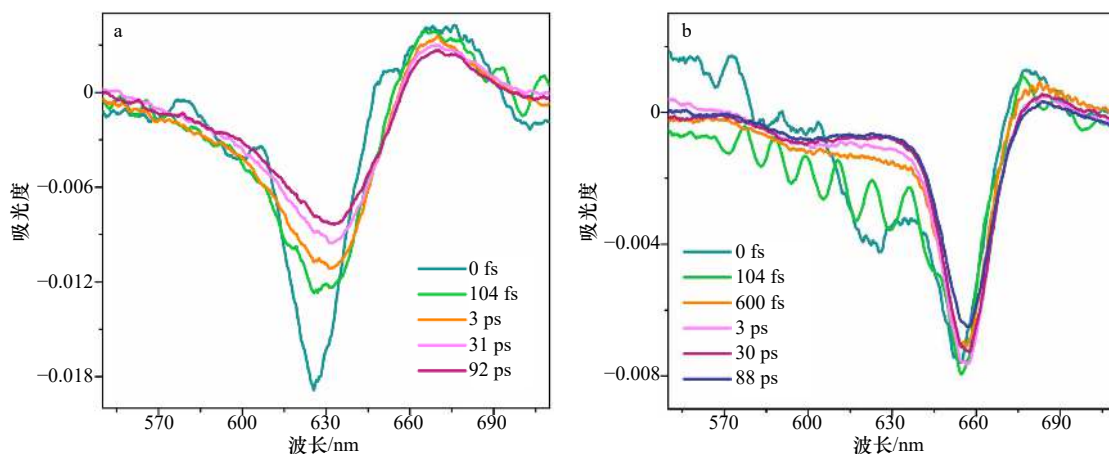


图 9 rAPC 单体及三聚体不同时间下的瞬态光谱变化

Fig. 9 Energy transfer dynamics of rAPC monomer and trimer at several delay times

a. rAPC 单体在不同时间分辨率下的瞬态光谱变化; b. rAPC 三聚体在不同时间分辨率下的瞬态光谱变化

a. Transient spectral change of rAPC monomers at different time resolutions; b. transient spectral change of rAPC trimers at different time resolutions

有锐利的特征吸收峰,并伴随着较弱的 590 nm 和较强的 620 nm 的肩峰信号(图 9b)以及 680 nm 处的正峰信号。655~658 nm 处锐利的峰形符合强激子耦合的光谱特征。在 590~600 nm 范围内,始终存在的负吸收信号与吸收光谱结果一致。结合吸收光谱的结果分析,我们认为,此处可能存在弱耦合的色素对。但由于宽带泵浦探测光谱的动力学分析并没有与此相关的动力学过程,且 600 fs 内,600 nm 左右的泵浦探测光谱波动较大,因此无法确定传能过程。但考虑到该峰并不存在于 rAPC 单体中(图 9a),590~600 nm 范围内的负峰被认为可能与三聚体的能量传递有关。此外,rAPC 三聚体的泵浦探测光谱显示,稳定存在着一个 680 nm 的正信号,该信号在 rAPC 单体的宽

带泵浦探测光谱中也一直存在。已有其他文献报道<sup>[27]</sup>,该信号对应于第一激发态往更高的电子激发态跃迁所产生的激发态吸收过程。另外,在三聚体中还可能包含了激子耦合所产生的双激子态所造成的激发态吸收过程。

## 4 结论

本实验对 rAPC 三聚体在室温下进行了多种光谱探测,并设立 rAPC 单体为对照组,这些光谱在不同的光谱分辨率下反映了 rAPC 三聚体的传能过程。

其中,稳态光谱结果证明,rAPC 三聚体具有和天然 APC 一样的光谱特性,这些特性由三聚体独特的蛋白结构导致的独特的生色团微环境决定,因此,光

谱特性一定程度上反映了 rAPC 三聚体的蛋白结构。而 CD 光谱证明了 rAPC 单体组装成 rAPC 三聚体时,并不改变蛋白质的二级结构,但是会影响发色团的微环境。同时 CD 光谱证实了 650 nm 处激发态的激子分裂情况,这是证明 rAPC 三聚体发色团及蛋白结构特性的另一有力证据。但是由于环境异质性,在 CD 光谱中我们并没有看到弱耦合对的存在。

宽带泵浦探测光谱的动力学结果证实了 rAPC 三聚体中存在 300~600 fs 时间尺度的 620~650 nm 的传能过程,且该过程不存在于 rAPC 单体中。这证明了 rAPC 三聚体的结构完整性,且传能过程与天然 APC

一致。此外,我们还测到了 19 fs 的超短寿命常数,这和其他研究报道的可能的激子态的电子退相干时间基本一致。值得注意的是,590 nm 处的激发态在传能动力学过程中也一直存在。然而,该激发态的来源和去向我们并不能清晰的判断,但在后续的实验中,我们将利用二维电子光谱等技术,继续深入研究该激发态与弱耦合色素对相关的能量传递之间的关系。

本实验通过结合多种光谱学手段,对 rAPC 的能量传递过程进行了探测,这为阐明 APC 传能的本质,揭示藻胆体的高效能量传递机制提供了数据基础。

### 参考文献:

- [1] Büchel C. Evolution and function of light harvesting proteins[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 172: 62–75.
- [2] Guglielmi G, Cohen-Bazire G, Bryant D A. The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes[J]. *Archives of Microbiology*, 1981, 129(3): 181–189.
- [3] Green B R. What happened to the phycobilisome?[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 748.
- [4] 王肖肖,秦松,杨革,等.藻胆体的结构与能量传递功能[J]. *海洋科学*, 2017, 41(12): 139–145.  
Wang Xiaoxiao, Qin Song, Yang Ge, et al. Structure and energy transfer of phycobilisome[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(12): 139–145.
- [5] 赵福利,张景民,郑锡光,等.红藻藻胆体内部蛋白间的能量传递研究人工合成复合物R-PE/R-PC以及R-PE/APC内的能量传递[C]//第九届全国凝聚态光学性质学术会议论文集.珠海:中国物理学会,1999.  
Zhao Fuli, Zhang Jingmin, Zheng Xiguang, et al. Energy transfer among proteins in the phycobilisome of red algae: Energy transfer in synthesized complex of R-PE/R-PC and R-PE/APC[C]//National Conference on Optical Properties of Condensed Matter. Zhuhai: Chinese Physical Society, 1999.
- [6] Kirilovsky D, Büchel C. Chapter Nine—Evolution and function of light-harvesting antenna in oxygenic photosynthesis[J]. *Advances in Botanical Research*, 2019, 91: 247–293.
- [7] Marx A, Adir N. Allophycocyanin and phycocyanin crystal structures reveal facets of phycobilisome assembly[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(3): 311–318.
- [8] Liu Jinyu, Jiang Tao, Zhang Jiping, et al. Crystal structure of allophycocyanin from red algae *Porphyra yezoensis* at 2.2-Å resolution[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(24): 16945–16952.
- [9] MacColl R. Allophycocyanin and energy transfer[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2004, 1657(2/3): 73–81.
- [10] Karpulevich A A, Maksimov E G, Sluchanko N N, et al. Highly efficient energy transfer from quantum dot to allophycocyanin in hybrid structures[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 160: 96–101.
- [11] Womick J M, Moran A M. Vibronic enhancement of exciton sizes and energy transport in photosynthetic complexes[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(6): 1347–1356.
- [12] Zhang J M, Shiu Y J, Hayashi M, et al. Investigations of ultrafast exciton dynamics in allophycocyanin trimer[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2001, 105(39): 8878–8891.
- [13] Womick J M, Moran A M. Exciton coherence and energy transport in the light-harvesting dimers of allophycocyanin[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(48): 15747–15759.
- [14] Edington M D, Riter R E, Beck W F. Evidence for coherent energy transfer in allophycocyanin trimers[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, 99(43): 15699–15704.
- [15] Collini E, Wong C Y, Wilk K E, et al. Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature[J]. *Nature*, 2010, 463(7281): 644–647.
- [16] Dean J C, Mirkovic T, Toa Z S D, et al. Vibronic enhancement of algae light harvesting[J]. *Chem*, 2016, 1(6): 858–872.
- [17] Liu Shaofeng, Chen Yingjie, Lu Yandu, et al. Biosynthesis of fluorescent cyanobacterial allophycocyanin trimer in *Escherichia coli*[J]. *Photosynthesis Research*, 2010, 105(2): 135–142.
- [18] Su Hainan, Xie Binbin, Chen Xiulan, et al. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(1): 65–70.
- [19] Dagnino-Leone J, Figueroa M, Uribe E, et al. Biosynthesis and characterization of a recombinant eukaryotic allophycocyanin using prokaryotic accessory enzymes[J]. *Microbiology Open*, 2020, 9(3): e989.
- [20] 李文军,蒲洋,牛壮,等.重组别藻蓝蛋白三聚体结构与功能[J]. *科学通报*, 2017, 62(16): 1699–1713.  
Li Wenjun, Pu Yang, Niu Zhuang, et al. Structural and functional investigation of allophycocyanin trimer[J]. *Chinese Science Bulletin*,

- 2017, 62(16): 1699–1713.
- [21] Zhu Ruidan, Zou Jiading, Wang Zhuan, et al. Electronic state-resolved multimode-coupled vibrational wavepackets in oxazine 720 by two-dimensional electronic spectroscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2020, 124(45): 9333–9342.
- [22] 王云鹏, 王专, 翁羽翔. 凝聚相分子振动量子拍的20 fs时间分辨光谱实时观测[J]. *科学通报*, 2012, 57(31): 2895–2898.  
Wang Yunpeng, Wang Zhuan, Weng Yuxiang. Real-time observation of vibrational quantum beat in condensed phase by 20 fs time-resolved spectroscopy[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(31): 2895–2898.
- [23] Roychoudhuri C. Causal Physics: Photons by Non-Interactions of Waves[M]. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- [24] Homoelle B J, Edington M D, Diffey W M, et al. Stimulated photon-echo and transient-grating studies of protein-matrix solvation dynamics and interexciton-state radiationless decay in  $\alpha$  phycocyanin and allophycocyanin[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102(16): 3044–3052.
- [25] McGregor A, Klartag M, David L, et al. Allophycocyanin trimer stability and functionality are primarily due to polar enhanced hydrophobicity of the phycocyanobilin binding pocket[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 384(2): 406–421.
- [26] Sonani R R, Gupta G D, Madamwar D, et al. Crystal structure of allophycocyanin from marine cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124580.
- [27] Edington M D, Riter R E, Beck W F. Interexciton-state relaxation and exciton localization in allophycocyanin trimers[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, 100(33): 14206–14217.
- [28] MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes[J]. *Journal of Structural Biology*, 1998, 124(2/3): 311–334.
- [29] Brejc K, Ficner R, Huber R, et al. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 249(2): 424–440.
- [30] 苏海楠. 蓝藻与红藻中藻胆蛋白的活性构象研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.  
Su Hainan. Study on the active conformations of phycobiliproteins from cyanobacteria and red algae[D]. Jinan: Shandong University, 2010.
- [31] 蒲洋. 重组别藻蓝蛋白三聚体结构鉴定及敏化特性的研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.  
Pu Yang. Structure determination and sensitization property study of recombinant allophycocyanin trimer[D]. Beijing: The University of Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [32] Van Grondelle R, Novoderezhkin V I. Energy transfer in photosynthesis: experimental insights and quantitative models[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2006, 8(7): 793–807.
- [33] Beljonne D, Curutchet C, Scholes G D, et al. Beyond Förster resonance energy transfer in biological and nanoscale systems[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(19): 6583–6599.
- [34] Holzwarth A R, Bittersmann E, Reuter W, et al. Studies on chromophore coupling in isolated phycobiliproteins: III. Picosecond excited state kinetics and time-resolved fluorescence spectra of different allophycocyanins from *Mastigocladus laminosus*[J]. *Biophysical Journal*, 1990, 57: 133–145.
- [35] O'carra P, Murphy R F, Killilea S D. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification[J]. *The Biochemical Journal*, 1980, 187(2): 303–309.
- [36] Croce R, Van Amerongen H. Natural strategies for photosynthetic light harvesting[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(7): 492–501.
- [37] Rodger A, Nordén B. Circular Dichroism and Linear Dichroism[M]. Oxford: Oxford University Press, 1996.
- [38] Sreerama N, Woody R W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra[J]. *Methods in Enzymology*, 2004, 383: 318–351.
- [39] Woody R W, Tinoco Jr I. Optical rotation of oriented helices. III. calculation of the rotatory dispersion and circular dichroism of the  $\alpha$ - and  $3_{10}$ -helix[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1967, 46(12): 4927–4945.
- [40] Bhalerao R P, Gillbro T, Gustafsson P. Functional phycobilisome core structures in a phycocyanin-less mutant of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942[J]. *Photosynthesis Research*, 1995, 45(1): 61–70.
- [41] Csatorday K, MacColl R, Csizmadia V, et al. Exciton interaction in allophycocyanin[J]. *Biochemistry*, 1984, 23(26): 6466–6470.
- [42] Shiu Y J, Zhang J M, Hayashi M, et al. A transient absorption study of allophycocyanin[J]. *Journal of Chemical Sciences*, 2002, 114(6): 611–621.
- [43] Zhao Fuli, Zheng Xiguang, Zhang Jingmin, et al. Model of chromophore coupling in allophycocyanin aggregation[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(14): 1224–1229.
- [44] Donovan B, Walker L A, Yocum C F, et al. Transient absorption studies of the primary charge separation in photosystem II[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, 100(5): 1945–1949.
- [45] Fleming G R, Cho M. Chromophore-solvent dynamics[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 1996, 47(1): 109–134.
- [46] Bagchi B, Jana B. Solvation dynamics in dipolar liquids[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(6): 1936–1954.
- [47] Cong Peijun, Deuel H P, Simon J D. Using optical coherence to measure the ultrafast electronic dephasing of large molecules in room-temperature liquids[J]. *Chemical Physics Letters*, 1993, 212(3/4): 367–373.
- [48] Wong C Y, Alvey R M, Turner D B, et al. Electronic coherence lineshapes reveal hidden excitonic correlations in photosynthetic light harvesting[J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(5): 396–404.
- [49] Riter R R, Edington M D, Beck W F. Protein-matrix solvation dynamics in the  $\alpha$  subunit of C-phycocyanin[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, 100(33): 14198–14205.

## Ultra-fast energy transfer process of recombinant allophycocyanin

Zhen Zhanghe<sup>1</sup>, Zhu Ruidan<sup>2,3</sup>, Qin Song<sup>1,4</sup>, Chen Hailong<sup>3</sup>, Pu Yang<sup>5</sup>, Weng Yuxiang<sup>2,3</sup>, Li Wenjun<sup>1,4</sup>

(1. *Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*; 3. *Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics/Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*; 4. *Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*; 5. *School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China*)

**Abstract:** Phycobilisomes are photosynthetic light-harvesting antenna complexes unique to red algae and cyanobacteria. Allophycocyanin (APC) is the main component of the core structure of phycobilisomes. In this experiment, recombinant allophycocyanin (rAPC) was used as the material, and the structure conformation and energy transfer process of rAPC were studied through steady-state spectroscopy, circular dichroic spectroscopy, and ultrafast time-resolved spectroscopy. The results show that rAPC can maintain the same spectral characteristics and active conformation as natural APC under the test conditions; after rAPC monomers are assembled into trimer, the results confirmed that  $\alpha 84\text{PCB}$  and  $\beta 84\text{PCB}$  can form an exciton pigment pair which can improve the energy transfer efficiency of the rAPC trimer through exciton splitting; ultrafast time-resolved spectroscopy results show that the energy transfer time from 620 nm to 650 nm is 300–600 fs, and there is also a 19 fs exciton state electronic decoherence process. These results provide a data basis for revealing the efficient energy transfer mechanism of phycobilisomes.

**Key words:** allophycocyanin; recombination and heterologous expression; energy transfer; steady-state spectrum; transient spectrum